

## MELAS点変異(塩基番号3243A G変異)の病態解明に関する研究

著者	花水 啓
号	2563
発行年	1993
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/20954">http://hdl.handle.net/10097/20954</a>

氏 名（本籍）はなみずひろし  
花 水 啓

学 位 の 種 類博士（医学）

学 位 記 番 号医第2563号

学位授与年月日平成5年9月8日

学位授与の条件学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴昭和60年3月25日  
三重大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目MELAS 点変異（塩基番号 3243A→G 変異）の病  
態解明に関する研究

（主 査）

論文審査委員教授多田啓也教授今野多助

教授 成 澤 邦 明

## 論文内容要旨

ミトコンドリアは、細胞内に数千個存在する小器官であり、その内膜に存在する電子伝達系酵素群により酸化的リン酸化反応を行い、生命活動に必要なエネルギーのほとんどすべてを供給している。ミトコンドリア病は、この電子伝達系機能が障害され、細胞は低能率な嫌気性代謝に依存し、エネルギーを大量に必要とする骨格筋、中枢神経系を中心に全身諸臓器の機能が侵される疾患群である。MELAS はミトコンドリア病の一種であり、若年発症例が多く小児科領域に症例が集積し、臨床的には筋力低下、精神運動退行、乳酸アシドーシス等のミトコンドリア病に共通の症状の他に発作性嘔吐、痙攣、片麻痺などを反復する卒中様の症状を呈する疾患である。近年、分子遺伝学手法を用いた検索により MELAS 患者のミトコンドリア DNA (mtDNA) 上の tRNA-Leu (UUR) 領域の塩基番号3243に A から G の点変異 (3243AG 変異) が発見された。この変異は80%の症例に認められ、正常人や他のミトコンドリア病患者からは検出されず、多くの種で保存されている塩基上の変異であることから病因と推定された。我々は以前より MELAS 症例の生検筋の生化学的検討において電子伝達系の Complex I 活性が欠損している事を報告してきた。しかし、3243AG 変異と病態に最も関係すると考えられる生化学的異常との関連性については、十分解明されていない。本研究では、この点を明らかにし、MELAS の病因としての 3243AG 変異の病態の検討を目的とした。

### 【対象・方法】

対象は、生検筋 mtDNA に 3243AG 変異を認めた12症例である。筋組織の 3243AG 変異率と筋における電子伝達系酵素活性値、及び、臨床症状の1つである卒中様発作の初発時年齢との相関性を検討した。次に、変異率と酵素活性の関係について明らかにする目的で、以下の2種類の培養系で実験を行った。変異が培養皮膚線維芽細胞にも存在する症例があることに注目し、変異を持つ皮膚線維芽細胞を SV40 にてクローン化し、クローン化細胞の変異率と電子伝達系酵素活性、酵素蛋白量の関係を検索した。更に変異 mtDNA をもつ脱核皮膚線維芽細胞と mtDNA を取り除いた HeLa 細胞とを融合させて作製した新しい形質転換細胞を用い、同様の実験を行った。

### 【結果】

①対象生検筋の 3243AG 変異率は50%~80%であり、正常 mtDNA とヘテロプラスミーの状態 で存在していた。変異率と卒中様症状初発年齢、及び、Complex I 活性は明らかな負の相関性を示した。免疫ブロットによる検索では、Complex I 蛋白の複数のサブユニットの低下が認めら

れ、特に 75KD 蛋白の低下が著明であった。

②SV40 にてクローン化した 3243AG を有する患者培養皮膚線維芽細胞は、多様な変異率を持ち、その変異率は継代培養にて変動はなかった。クローン化細胞では変異率が62%以上になると Complex I の著明な活性低下と酵素蛋白量の低下が認められた。

③mtDNA を除いた HeLa 細胞と 3243AG 変異をもつ脱核線維芽細胞との融合細胞での生化学的検討では、88%以上の変異率を持つ細胞で Complex I 活性の著明な低下が認められた。

## 【考 案】

生検筋の 3243AG 変異率と Complex I 活性および MELAS に特徴的な卒中様発作初発年齢の間に負の相関関係を認めたことは、3243AG 変異が、Complex I 活性を低下させ、臨床症状発現に関与すると推測される。そこで変異率の異なる培養細胞系にて Complex I 活性を測定し、変異率と活性値、酵素蛋白量について検討した。培養系は3243AG 変異をもつ培養皮膚線維芽細胞をクローン化した系と細胞融合の手法で核を HeLa 細胞核に置換した系を用いた。特に融合細胞系では、核遺伝子を統一化することで、ミトコンドリア遺伝子の変異と機能の関係が明確化すると考えられた。結果的には2つの系で変異率は異なるが Complex I 活性及び酵素蛋白量の著明に低下する変異率が存在することが明らかとなった。他の電子伝達系酵素活性の低下は軽度であった。以上より 3243AG 変異が、主に Complex I 酵素蛋白量を低下させ、その結果活性が低下し臨床症状を発現させることが明らかとなった。3243AG 変異により、主に Complex I 蛋白が減少する理由は、核遺伝子由来のサブユニット低下も認めることから、複合体構造の不安定性が他の複合体よりも著しい事が原因と考えられる。また臨床例の生検筋における 3243AG 変異率が、培養系の Complex I 活性を低下させる変異率よりも低い変異率で発症している例があるが、この理由として変異 mtDNA の組織間分布の個体間の多様性、核遺伝子の影響、加齢に伴うミトコンドリア機能の低下などの要因を想定している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ミトコンドリア病の1つであるMELASは若年発症例が多く臨床的には筋力低下，精神運動退行，乳酸アシドーシス等のミトコンドリア病に共通の症状の他に，発作性嘔吐，痙攣，片麻痺などを反復する卒中様の症状を呈する疾患である。近年，分子遺伝学的検索によりMELAS患者のミトコンドリアDNA (mtDNA) 上のtRNA-leu (UUR) 領域の塩基番号3243にAからGの点変異 (3243AG変異) が発見された。この変異は80%の症例に認められ，一方正常人や他のミトコンドリア病では見出されないことからMELASの病因と考えられている。しかしこの変異がMELASの病態に如何に関わっているかは不明であり，本研究はこの点を明らかにする目的で行われた。

mtDNAに3243AG変異を認めたMELAS患者の生検筋組織を用い，3243AG変異率と電子伝達系酵素活性値，卒中様発作の初発年齢との相関を検討した。対象生検筋における3243AG変異率は50～80%であり，正常mtDNAとヘテロプラスミーの状態で存在していた。変異率と卒中様症状初発年齢及びComplex I 活性は明らかな負の相関性を示した。免疫ブロットによる検索ではComplex I 蛋白の複数のサブユニットの低下が認められ，特に75KD蛋白の低下が著明であった。

さらに3243AG変異をもつ培養皮膚線維芽細胞をクローン化した系と細胞融合法により核をHeLa細胞核に置換した系を用いて検討した結果，2つの系で変異率は異なるがComplex I 活性及び酵素蛋白量が著明に低下する変異率が存在することが示された。これらの成績により3243AGは主としてComplex I 酵素蛋白量を低下させ，その結果活性低下を来し臨床症状を発現させることが明らかにされた。

以上の研究は，ミトコンドリア病の1つであるMELASの病態生理の解明に新しい知見を加えたものであり，医学博士の学位に値するものと評価された。